مجله ديابت و ليپيد ايران. زمستان ١٣٨٤؛ دوره ٥ (شماره ٢): ١٠٨-٩٩

بررسي اثر گلوكزآمين بر فعاليت آنزيم‌هاي گلوكوكيناز و هگزوكيناز پانكراس و ارتباط آن با ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي نوع ٢

محمود خياطيان[١]، بيژن فرزامي*[١] ، ابراهيم ميرزا جاني[٢]، باقر لاريجاني[٣]، محمد تقي‌خاني[٤]، سيده زهرا بطحايي[٤]، صفورا ورداسبي[١]، اسماعيل علمي آخوني[١]

چكيده

مقدمه: آنزيم گلوكوكيناز به عنوان حسگر گلوكز در سلول‌هاي β جزاير لانگرهانس پانكراس(لوزالمعده) مطرح بوده و در هوموستاز گلوكز و ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز (GSIS) نقشي كليدي را ايفا مي‌كند. در تحقيق حاضر، اثر غلظت هاي مختلف گلوكزآمين (مهار كنندة گلوكوكيناز) بر روي فعاليت آنزيم‌هاي گلوكوكيناز و هگزوكيناز پانكراس و بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس جدا شده از پانكراس موش صحرايي، مورد بررسي قرار گرفت.
روش‌ها: جزاير لانگرهانس با تكنيك هضم كلاژناز از موش‌هاي صحرايي سالم و يك نوع مدل حيواني از ديابت نوع II (موسوم به nSTZ)جدا گرديد. فعاليت آنزيمي با اندازه‌گيري سرعت تشكيل گلوكز–٦- فسفات به كمك تغييرات نشر فلوئورسانس تعيين گرديد. با تكنيك انكوباسيون استاتيك، ترشح انسولين از جزاير دستچين شده مورد ارزيابي قرار گرفت. ميزان انسولين با روش الايزا اندازه‌گيري شد.
يافته‌ها: نتايج ما نشان داد كه گلوكزآمين، فعاليت گلوكوكيناز را در عصاره جزاير به صورت وابسته به دوز كاهش مي‌دهد، اما اثري بر فعاليت هگزوكيناز ندارد. همچنين نتايج حاصل از انكوباسيون گلوكزآمين در غلظت هاي مختلف با جزاير لانگرهانس نشان داد كه ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز مهار مي‌گردد، اما اين ماده بر ترشح انسولين پايه هيچ‌گونه اثر مهاري اعمال نمي‌كند. در موش‌هاي ديابتي فعاليت گلوكوكيناز كاهش يافته بود در حالي كه در اين حيوانات، ترشح انسولين پايه و نيز فعاليت هگزوكيناز بيشتر از موش‌هاي سالم بود.
نتيجه‌گيري: براساس نتايج حاصل از اين تحقيق مي‌توان برآورد نمود كه كاهش فعاليت آنزيمي گلوكوكيناز جزاير پانكراس، احياناً مي‌تواند در كاهش ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز دخالت داشته باشد. افزايش ترشح انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي مي تواند ناشي از افزايش فعاليت هگزوكيناز پانكراس باشد.

واژگان كليدي: گلوكزآمين، جداسازي جزاير، ترشح انسولين، گلوكوكيناز، هگزوكيناز، ديابت نوع ٢

☑ *.اين مقاله در كنگرة* *Diabetes Mellitus and the Control of Cellular Energy Metabolism* *كه در تاريخ ٢١ لغايت ٢٦ ژانويه ٢٠٠٦ در شهر ونكوور كانادا برگزار گرديد، ارائه شده است.*

١- گروه بيوشيمي پزشكي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي تهران
٢- گروه بيوشيمي، دانشكده پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي گيلان
٣- مركز تحقيقات غدد درون‌ريز و متابوليسم، دانشگاه علوم پزشكي تهران
٤- گروه بيوشيمي باليني، دانشكده علوم پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس

* *نشاني*: تهران، خيابان قدس، خيابان پورسينا، دانشكده پزشكي، گروه بيوشيمي، صندوق پستي: ٥٣٩٩-١٤١٥٥
تلفن/ نمابر: ٨٨٩٥٩٧٤٥ ؛ پست الكترونيك: Farzamib@sina.tums.ac.ir

تاريخ دريافت: ٨٤/٣/٢٥
تاريخ پذيرش: ٨٤/١٠/٢٠

مقدمه

گلوكوكيناز (EC. 2. 7.1.2) تبديل گلوكز سيتوپلاسمي را به گلوكز-٦-فسفات، هم در هپاتوسيت‌ها و هم در سلول‌هاي بتاي پانكراس كاتاليز مي‌كند [١]. گلوكوكيناز از جمله آنزيم‌هايي است كه تحت عنوان هگزوكيناز نيز ناميده مي‌شوند. وزن مولكولي هگزوكينازهاي I،II و III، ١٠٠ كيلو دالتون بوده و داراي ميل تركيبي زيادي براي گلوكز هستند (٣٠μM-٢٠ = Km) و توسط محصول عملشان يعني گلوكز-٦-فسفات بطور پس نورد مهار مي‌شوند؛ درحالي كه گلوكوكيناز (هگزوكيناز IV يا D) داراي اندازة كوچكتر (٥٠ KDa≃) و Km بالاتر (٥-٨mM) بوده و توسط گلوكز-٦-فسفات مهار نمي‌شود [٢].

گلوكوكيناز سه ويژگي منحصر به فرد دارد. يكي اين‌كه در غلظت‌هاي پايين گلوكز، از خود خاصيت تعاوني نشان مي‌دهد در حالي كه آنزيمي تك واحدي است [٢]. دوم اينكه توسط يك پروتيين فعاليتش تنظيم مي‌شود؛ كه اين پروتيين تحت عنوان پروتيين تنظيم كننده گلوكوكيناز (GKRP) شناخته شده و خاصيت مهاري دارد [٣]. سوم اين‌كه اين آنزيم داراي نقل و انتقال[1] بين هسته و سيتوپلاسم مي‌باشد [٤]. اين دو ويژگي اخير در دهة گذشته شناخته شده‌اند.

رابطة آنزيم گلوكوكيناز با ترشح انسولين توسط چندين گروه از پژوهشگران مطالعه شده و سازوكار مولكولي دخيل در القاي ترشح انسولين توسط گلوكز، موضوع پژوهش‌هاي بسياري بوده است. در اين راستا چند نظريه ارائه گرديده است. يكي از اين نظريات، فرضية سوخت[2] نام دارد. براساس اين فرضيه، متابوليسم گلوكز مسؤول ايجاد سيگنال براي ترشح انسولين بوده و گلوكوكيناز، حسگر گلوكز در سلول‌هاي بتاي پانكراس است [٥]. تصور مي‌شود كه مرحلة اصلي محدود كنندة سرعتِ متابوليسم گلوكز در سلول‌هاي بتاي پانكراس، فسفريلاسيون گلوكز باشد؛ از اين رو فسفريلاسيون گلوكز نقشي حياتي در ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز (GSIS) دارد [١] و كاهش ميزان فعاليت آنزيم گلوكوكيناز در اين سلول‌ها به نقص در GSIS مي‌انجامد [٦]. از سوي ديگر، موتاسيون در ژن گلوكوكيناز كه تاكنون به تعداد ١٩٠ مورد گزارش گرديده [٧]، غالباً منجر به نوعي ديابت نوع II تحت عنوان MODY-2 (ديابت نوع II جوانان) مي‌شود [٨]. با كشف چند فعال كنندة گلوكوكيناز براي اولين بار در يكي دو سال گذشته [٩، ١٠] و با توجه به كابردهاي درماني احتمالي اين تركيبات، به نظر مي‌آيد كه كار بر روي عوامل مؤثر بر گلوكوكيناز اهميت فزونتري يافته است. اما درمورد مهار كنندگان گلوكوكيناز، بيشتر پژوهش‌ها بر روي گلوكوكيناز كبد متمركز گرديده است [١١] و از آنجا كه به نظر مي‌رسد گلوكوكيناز پانكراس به طرزي متفاوت از گلوكوكيناز كبد تنظيم مي شود [١٢]، مطالعة اثر مهار كنندگان بر روي گلوكوكيناز پانكراس ضروري مي‌نمايد. اخيراً نيز ارتباط راه متابوليسمي هگزوز آمين [١٣] و از همه مهمتر گلوكزآمين [١٤] با سوء عملكرد سلول‌هاي بتا[3] پانكراس توسط برخي از محققان گزارش گرديده است. از سوي ديگر، عليرغم توليد موش‌هاي فاقد گلوكوكيناز پانكراس (ناك اوت شده) باتوجه به مرگ آور بودن اين دستكاري ژني در چند روز اول پس از تولد، امكان بررسي‌هاي متابوليك در اين مدل حيواني ديابت نوع II وجود ندارد [١٥] و از طرفي درخصوص اثر گلوكزآمين بر ترشح انسولين، گزارش‌هاي ضد و نقيضي وجود داشت[١٨-١٦]، از اين رو بر آن شديم تا اثر گلوكزآمين كه امروزه استفاده وسيعي در ترميم غضروف دارد، بر روي گلوكوكيناز و هگزوكيناز پانكراس و نيز بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس جدا شده از موش‌هاي صحرايي سالم و يك نوع مدل حيواني از موش‌هاي ديابتي نوع II (nSTZ) كه دچار سوء عملكرد سلول‌هاي بتاي پانكراس هستند بررسي نماييم.

---

[1] Translocation
[2] Fuel Hypothesis
[3] β-cell dysfunction

روش‌ها

حيوانات آزمايشگاهي

موش‌هاي صحرايي نر، نژاد ويستار-آلبينو بـا وزن ٢٠ ± ٣٠٠ گرم تحت رژيم غذايي طبيعي در حيوانخانة گـروه بيوشـيمي پزشـكي نگهـداري مـي‌شـدند. در هـر روز آزمايش، دو موش صحرايي كه از شب قبـل بـه حالـت ناشتا نگهداشته شده بودند پس از تزريق داخل صـفاقي ٨٠ mg/kg تيوپنتال، بيهوش و جهت برداشتن پانكراس جراحي مي‌شدند.

جداسازي جزاير لانگرهانس

جداسازي و تخليص جزاير لانگرهانس به روش ليـسي و كاستيانوفسكي [١٩] با اندكي تغييرات انجام گرفـت. پانكراس (لوزالمعده) با كانوله كـردن مجـراي مـشترك صـفراوي و تزريـق ٢٠-١٥ ميلـي‌ليتـر محلـول سـرد هانكس، پرفيوز و جدا مي‌گرديـد. پـانكراس‌هـاي جـدا شده با قيچي به قطعات ريز يك تا دو ميلي‌متـري خـرد گرديده و دو الي ٣ بار با محلول كربس حـاوي گلـوكز ٢/٨ ميلي مولار شستشو داده مي شـدند. سـپس جهـت هضم بافت پانكراس، كلاژناز به محيط اضـافه مـي‌شـد. اين آنزيم در درجه حرارت °٣٧ سانتي گـراد بـه مـدت ١٧-١٥ دقيقه درحالت تكان شـديد بـر بافـت اثـر داده مي‌شد. جزايـر لانگرهـانس حاصـله پـس از چنـد بـار شستشو بـا محلـول كـربس سـرد محتـوي ٠/٥ درصـد BSA، در زيـر استرئوميكروسـكوپ بـه كمـك پيپـت پاستور دستچين گرديـده و در ويـال‌هـاي انكوباسـيون شيشه‌اي سيليكونيزه قرار داده مي شدند.

ترشح انسولين

پس از قرار دادن ٥ جزيره در هر ويال انكوباسيون، يك ميلي‌ليتر محلول كربس حاوي ٢/٨ ميلي مـول گلـوكز به آنها اضافه مي‌شد. ويال‌ها بـه مـدت نـيم سـاعت در دماي C °٣٧ در حمام شـيكردار و جريـان مـداوم گـاز كاربوژن (٩٥ ٪ اكـسيژن و ٥ ٪ دي اكـسيد كـربن) پـره انكوبه مي‌شدند. سپس در زير استرئوميكروسـكوپ بـه كمك پيپت پاستور نوك خميده، محلول پره انكوباسيون به طور كامل برداشته و مجـدداً تعـداد جزايـر شـمارش مي‌شد. سپس يك ميلي‌ليتر محلول انكوباسـيون حـاوي ٢/٨ يا ١٦/٧ ميلي‌مولار گلوكز بدون دارو و يا همراه بـا گلـوكزآمين در غلظـت هـاي ٢/٥، ٥، ١٠ و ٢٠ ميلـي مولار به آن اضافه مي‌گرديد. ويال‌هـا مجـدداً در همـان شرايط پيشين به مدت يك ساعت انكوبه مي‌شـدند. در پايان انكوباسيون، محلول رويـي برداشـته و در فريـزر نگهداري مي‌شد. اندازه‌گيري انسولين به طريق ELISA و بـا كيـت مخـصوص انـسولين مـوش صـحرايي[1] از شركت DRG آلمـان براسـاس دسـتورات توليـد كننـده صورت پذيرفت.

فعاليت گلوكوكيناز و هگزوكيناز

فعاليت آنزيمي در سوپرناتانت هوموژنه (عصارة) جزاير با استفاده از روش ليانـگ و همكـاران [٢٠] بـا انـدكي تغييرات تعيين گرديد. در ايـن روش از طريـق واكـنش هـاي جفـت شـونده بـا آنـزيم گلـوكز–٦-فـسفات دهيـدروژناز از بـاكتري *Leuconostoc mesenteroides* سرعت تشكيل NADH از NAD^+ اندازه گيري مي‌شود. سيـــصد جزيـــرة پـــانكراس دســـتچين شـــده در ٣٠٠ ميكروليتر بافر هوموژنيزاسيون در هوموژنـايزر Kontes glass قرار داده مي‌شد. همگنة حاصـل در ١٢٠٠٠g بـه مدت ١٠ دقيقه سانتريفوژ مي‌شد تا هگزوكيناز متصل به ميتوكندري جـدا گـردد. محلـول رويـي (سـوپرناتانت) جهت سنجش گلوكوكيناز و هگزوكينـاز مـورد اسـتفاده قرار مي‌گرفت. همة اين مراحل در دماي حدود ٤ درجه سانتي‌گراد انجام گرديد.

جهت رسم منحني استاندارد، استانداردهاي گلـوكز–٦-فسفات در غلظت‌هـاي بـين ٠/٣ تـا ٣ نـانومولار تهيـه گرديد. استانداردها در ١٠٠ ميكروليتر مخلـوط سـنجش (محتـوي همـة اجـزاي مـورد نيـاز واكـنش بـا غلظـت مناسب)، در ويال‌هاي اپندورف ريخته مي‌شـد. پـس از انكوباسيون ويال‌هـا بـه مـدت ٩٠ دقيقـه در دمـاي ٣٠ درجه سانتي‌گراد، با افزودن بيكربنـات واكـنش متوقـف مي‌گرديد. سپس در طول موج تحريكي ٣٤٠ نـانومتر و

[1] Rat

طول موج نشري ٤٦٠ نانومتر، ميزان فلوئورسانس نمونه‌ها در مقابل بلانك معرف اندازه‌گيري مي‌شد.
جهت سنجش آنزيم، در روش فوق به جاي گلوكز-٦-فسفات، عصارة جزاير و نيز گلوكزآمين به ميزان ۲/۵ تا ۲۰ ميلي مولار به مخلوط سنجش افزوده مي‌شد. فعاليت گلوكوكيناز با تفريق فعاليت هگزوكيناز از فعاليت تام فسفريلاسيون گلوكز به دست مي‌آيد. يادآوري مي‌شود كه در پروتكل سنجش گلوكوكيناز دو نوع بلانك وجود دارد. يكي بلانك معرف كه حاوي همة اجزاء واكنش منهاي گلوكز-٦-فسفات و يا عصاره است و ديگري بلانك بافت كه حاوي عصارة جزاير به اضافة بافر سنجش محتوي ۰/۵ يا ۱۰۰ ميلي‌مول در ليتر گلوكز در غياب ATP است.

القاي ديابت نوع ۲

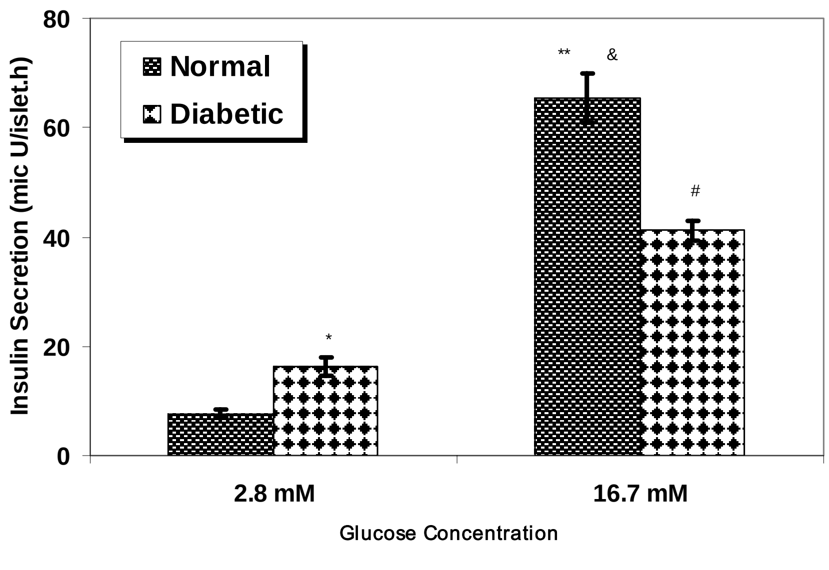
براي اين منظور به موش‌هاي صحرايي دو روزه، STZ (استرپتوزوتوسين) به ميزان ۹۰ ميلي‌گرم بر كيلوگرم وزن بدن از طريق داخل صفاقي تزريق گرديد [۲۱]. به منظور ارزيابي ديابتي شدن موش‌هاي نوزاد، ۳ روز پس از تزريق STZ، از قلب آنها خونگيري به عمل آمد. اندازه‌گيري گلوكز خون با كيت شركت زيست شيمي انجام شد. موش‌هايي كه داراي قند خون بالاتر از ۲۷۵ ميلي‌گرم بر دسي ليتر بودند به عنوان ديابتي در نظر گرفته مي‌شدند.

آناليز آماري

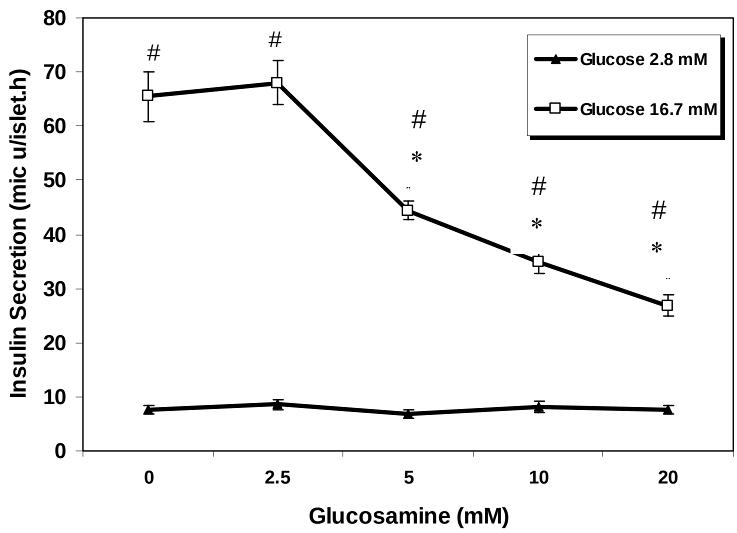
كل آزمايش‌ها به صورت دوتايي انجام گرديده و ميانگين اين دو به عنوان يك نقطه درنظر گرفته شده است. همة داده‌ها به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) بيان گرديده است. n تعداد دفعات تكرار آزمايش است (آزمايش‌ها ۶ الي ۷ بار تكرار شده است). داده ها به كمك نرم افزار SPSS آناليز گرديده و P-Value كمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معني‌دار آماري در نظر گرفته شده است.

يافته‌ها

در اين پژوهش، اثر گلوكزآمين (مهار كنندة گلوكوكيناز) با غلظت هاي ۲/۵ تا ۲۰ ميلي مولار بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس و نيز بر آنزيم‌هاي

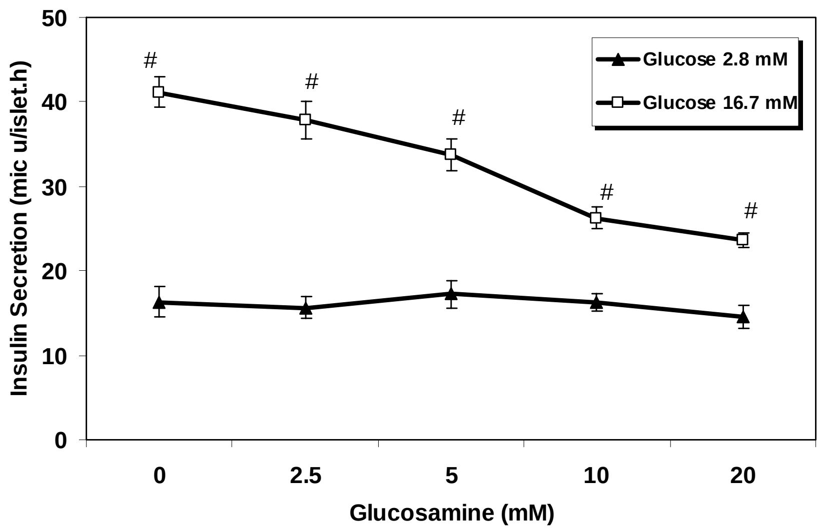


نمودار ۱- اثر غلظت‌هاي پايه و تحريكي گلوكز بر ترشح انسولين از جزاير جدا شدة موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي ترشح انسولين با شيوه انكوباسيون استاتيك طبق روشي كه در بخش *روش‌ها* آمده، تعيين گرديده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ۷ براي موش‌هاي سالم، n = ٦ براي موش‌هاي ديابتي. * P< ۰/۰۱ در قياس با موش هاي سالم. ** P< ۰/۰۱ در قياس با غلظت ۲/۸ ميلي مولار گلوكز. # P< ۰/۰۱ در قياس با غلظت ۲/۸ ميلي مولار گلوكز.



نمودار ٢- اثر غلظت‌هاي مختلف گلوكز آمين بر ترشح انسولين پايه و تحريك شده با گلوكز (**GSIS**) از جزاير لانگرهانس موش‌هاي صحرايي سالم

ترشح انسولين طبق روش ذكر شده در بخش *روش‌ها* با شيوة انكوباسيون استاتيك بررسي شده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ٧ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. # P< ٠/٠١ نسبت به غلظت ٢/٨ ميلي مولار گلوكز. * نشانگر تفاوت معني دار آماري (P< ٠/٠٥) نسبت به گروه كنترل.



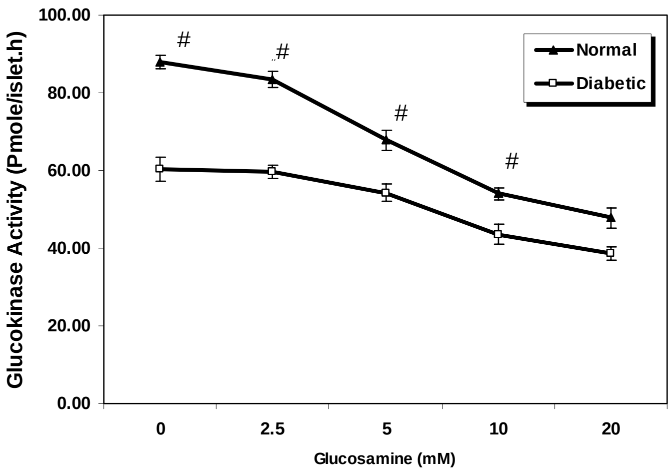
نمودار ٣- اثر غلظت‌هاي مختلف گلوكزآمين بر ترشح انسولين پايه و تحريك شده با گلوكز (**GSIS**) از جزاير لانگرهانس موش‌هاي صحرايي ديابتي.

بررسي ترشح انسولين با تكنيك انكوباسيون استاتيك بر طبق روش ذكر شده در بخش *روش‌ها* انجام گرديده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ٧ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. # P< ٠/٠١ نسبت به غلظت ٢/٨ ميلي مولار گلوكز.

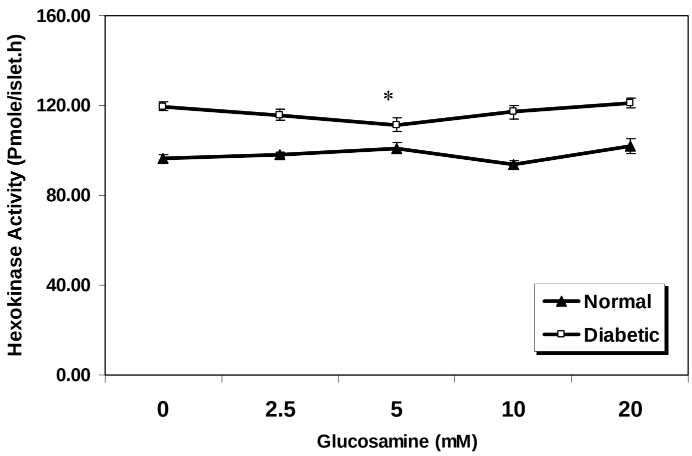
فسفريله‌كنندة گلوكز، گلوكوكيناز و هگزوكيناز پانكراس موش‌هاي صحرايي سالم و ديابتي بررسي گرديد كه نتايجي به شرح زير به دست آمد: نمودار ١، نتايج حاصل از اثر غلظت هاي ٢/٨ و ١٦/٧ ميلي مولار گلوكز بر ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس را نشان مي دهد. مقدار ترشح انسولين در غلظت پايه گلوكز

(۲/۸ ميلي مولار) در موش‌هاي ديابتي بيشتر از موش‌هاي سالم است (P< ۰/۰۱). مقدار ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز (GSIS) در موش‌هاي صحرايي ديابتي كمتر از موشهاي سالم است (P< ۰/۰۱). از سوي ديگر ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز هم در موش‌هاي سالم و هم در موشهاي ديابتي بسيار بيشتر از ترشح انسولين پايه مي‌باشد (P< ۰/۰۱).

در نمودارهاي ۲و ۳، اثر گلوكز آمين بر ترشح انسولين به تصوير كشيده شده است. همانطور كه از نمودارهاي فوق بر مي‌آيد، گلوكزآمين بر ترشح انسولين پايه اثري ندارد اما ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز ۱۶/۷ ميلي مولار را هم در موش‌هاي صحرايي سالم و هم ديابتي به صورت وابسته به دوز كاهش مي‌دهد (P< ۰/۰۵). يك همبستگي معكوس و معني دار در اين موارد وجود دارد (r = - ۰/۸۲۸ براي موش‌هاي سالم و r = - ۰/۸۱۵ براي موش‌هاي ديابتي).



نمودار۴- اثر غلظت‌های مختلف گلوکزآمین بر فعالیت گلوکوکیناز پانکراس در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی
فعاليت گلوكوكيناز طبق روشي كه در بخش روش‌ها آمده، اندازه گيري شده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ۷ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. # اختلاف معني دار آماري (P< ۰/۰۵) نسبت به موشهاي ديابتي.



نمودار ۵- اثر غلظت‌های مختلف گلوکز آمین بر فعالیت هگزوکیناز پانکراس در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی
فعاليت هگزوكيناز طبق روشي كه در بخش *روش‌ها* آمده، اندازه گيري شده است. مقادير به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد (Mean ± SE) ذكر شده اند. n = ۷ براي گروه كنترل، n = ٦ براي گروه‌هاي تيمار. * فقط در اين غلظت از گلوكزآمين به لحاظ آماري تفاوتي بين هگزوكيناز موش‌هاي سالم و ديابتي وجود ندارد (P> ۰/۰۵) .

نمودار ٤، نمايانگر اثر گلوكزآمين بر گلوكوكيناز پانكراس است. چنان‌كه ملاحظه مي‌شود گلوكزآمين چه در موش‌هاي سالم و چه در موش‌هاي ديابتي فعاليت گلوكوكيناز را نسبت به گروه كنترل به صورت وابسته به دوز كاهش مي دهد. يك همبستگي معني‌دار و معكوس در اين مورد وجود دارد (r = - ٠/٨٨٥ براي موشهاي سالم و r = - ٠/٨٠ براي موش‌هاي ديابتي). از سوي ديگر فعاليت گلوكوكيناز پانكراس در موش‌هاي ديابتي كمتر از موش‌هاي سالم است (P< ٠/٠١).

در نمودار ٥، اثر گلوكزآمين بر هگزوكيناز پانكراس منعكس شده است. پيداست كه گلوكزآمين هيچ‌گونه اثري بر هگزوكيناز چه در موش‌هاي سالم و چه ديابتي نداشته است. اما فعاليت هگزوكيناز در موش‌هاي ديابتي، (بجز در غلظت ٥ ميلي مولار گلوكزآمين) داراي اختلاف معني دار آماري با موش‌هاي سالم بوده است (P< ٠/٠١).

بحث

اگرچه تنظيم ترشح انسولين پيچيده بوده و هنوز هم اين فرآيند بطور كامل شناخته نشده است [١٧] و هرچند عليرغم چند دهه تحقيق فراوان، هنوز هيچ فرضيه واحدي كه GSIS را كاملا توضيح بدهد در دسترس نيست [٢٢]؛ اما گفته شده كه گلوكوكيناز پانكراس، آنزيم كاتاليزگر مرحلة محدود كنندة سرعت گليكوليز، در اين ميان نقش حياتي را ايفا مي‌كند [١، ٥، ٦، ٢٣]. در اين پژوهش، با استفاده از يك مهار كنندة آنزيم گلوكوكيناز، به بررسي نقش گلوكوكيناز و نيز هگزوكيناز در ترشح انسولين از جزاير لانگرهانس جدا شدة موش صحرايي پرداخته شد. يكي از اهداف نيز اين بوده كه نحوة اين ارتباط در موش‌هاي صحرايي nSTZ (مبتلا به ديابت نوع II) نيز بررسي گردد. در اين نوع ديابت تجربي، سلول‌هاي پانكراس در حين رشد موش بازسازي مي شوند [٢١] و بنابراين يك مدل خوب براي بررسي عملكرد پانكراس مي‌باشند.

نتايج حاصل از انكوباسيون جزاير با دو غلظت مهم گلوكز (نمودار١) نشان داد كه در موش‌هاي صحرايي سالم، ترشح انسولين در غلظت ١٦/٧ ميلي مولار گلوكز چندين برابر بيشتر از غلظت ٢/٨ ميلي مولار گلوكز است (P< ٠/٠١). البته اين امر، گرچه نشانگر سلامت جزاير لانگرهانس و درستي سامانه راه اندازي شده جهت جداسازي جزاير و پريفيوژن آنها است، اما چندان هم دور از انتظار نبود، چرا كه همة گزارش‌ها تأييد كنندة آن است. ليكن ترشح انسولين پايه (يعني ترشح انسولين در غلظت ٢/٨ ميلي مولار گلوكز) در موش‌هاي صحرايي ديابتي شده، بيشتر از موش‌هاي سالم بوده است. اين نتيجه با نتايج پيستون [٢٤]، يوشيكاوا [١٤] و چن[٢٥]، همخواني داشته، اما با برخي گزارش‌ها از جمله مقالة پورتا [٢٦] در تضاد است. در گزارش مذكور حتي ترشح انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي نصف موش‌هاي سالم بوده است.

علت افزايش ترشح انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي در قياس با موش‌هاي سالم، هنوز دقيقاً معلوم نگشته است. حتي اين حالت در موش‌هاي ٦٠٪ پانكراتكتومي شده نيز اتفاق افتاده كه آن محققان نيز گفته اند دليلش نامشخص است [٢٧]. اما ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز ١٦/٧ ميلي مولار (GSIS) در موش‌هاي ديابتي در مقايسه با موش‌هاي سالم كمتر است (نمودار ١). اين نتيجه با بسياري از گزارش‌هاي انتشار يافته همخواني دارد؛ كه احتمالاً به دليل آن است كه موش‌هاي اين نوع مدل حيواني از ديابت نوع II، دچار سوء عملكرد سلول‌هاي بتا و به تبع آن نقص در GSIS هستند [٢١، ٢٥، ٢٨، ٢٩] . در اغلب مدل‌هاي حيواني ديابت نوع II نيز وضعيت مشابهي مشاهده شده است.

گلوكزآمين بر ترشح انسولين در غلظت گلوكز پايه، اثري نداشته، اما موجب كاهش وابسته به دوز آن، هم در موش‌هاي سالم و هم در موش‌هاي ديابتي در غلظت گلوكز ١٦/٧ ميلي مولار شده است (نمودارهاي٢ و٣). اين مسأله يكي از موارد بحث انگيز در موضوع ترشح انسولين بوده است. چرا كه گاه نتايج دو پژوهش مختلف حتي از يك محقق نيز نتايج متفاوتي در پي داشته است. نتايج ما در اين باره با گزارش‌هاي بالكان [١٨] و كنتو [١٣] مشابهت داشته، اما متفاوت و حتي

متضاد با گزارش‌هاي زوليچ [١٦] و اشكرافت [۳۰] بوده است. از آنجا كه تحقيقات اخير مبين اثرات سوء گلوكزآمين بر سلول‌هاي بتا است [۱۳، ١٤]، به نظر مي‌آيد كه كاهش ترشح انسولين مربوط به اين تأثير باشد. اما، از سوي ديگر، در غلظت ۲/۸ ميلي مولار گلوكز، اثر كاهش دهندگي گلوكزآمين بر ترشح انسولين ديده نمي شود، شايد بتوان گفت كه اين بدان دليل است كه گلوكزآمين از طريق اثر بر گلوكوكيناز [كه در غلظت ۱۶/۷ گلوكز ايفاي نقش مي نمايد]، اثر سوء مهاري خود بر سلول‌هاي بتا را اعمال مي‌كند. گلوكزآمين فعاليت آنزيم گلوكوكيناز پانكراس را هم در موش‌هاي سالم و هم در موش‌هاي ديابتي نسبت به كنترل (بدون افزودن هيچگونه واكنش‌گري در محيط آزمايش)، به صورت وابسته به دوز كاهش داد (نمودار ۴). ليانگ و همكاران [۳۱] در يك پژوهش پنج نوع متفاوت از موش هاي ديابتي نوع II را مورد مطالعه قرار دادند. در همة موارد، GSIS يا كاهش يافته بوده و يا تأخير داشته است. نكتة جالب توجه تحقيق فوق، اين كه در سه نوع اين موش‌هاي ديابتي، فعاليت گلوكوكيناز جزاير بالاتر از موش‌هاي سالم بوده است. پژوهشگران مزبور نتيجه‌گيري كرده‌اند كه افزايش گلوكز خون و به تبع آن افزايش گلوكز جزاير، موجب القاي گلوكوكيناز شده است، هرچند در يك نوع از آنها نسبتاً وضعيت نرموگليسميك برقرار بوده است. نتايج ما در اين باره با نتايج اين گروه تحقيقاتي مغايرت دارد. از سوي ديگر مشابه نتايج چن [۳۲] و بالكان [۱۸] است. البته هنوز هيچ گزارشي مبني بر افزايش فعاليت گلوكوكيناز تحت تأثير گلوكزآمين وجود ندارد؛ كه اين هم بديهي به نظر مي‌رسد. چرا كه از گلوكزآمين به عنوان مهار كنندة اختصاصي گلوكوكيناز نام برده مي‌شود. يادآور مي شويم كه براساس نتايج پژوهش ما، اثر مهاري گلوكزآمين چه بر ترشح انسولين و چه بر فعاليت گلوكوكيناز به صورت وابسته به دوز[1] بوده است كه اين امر در نمودارهاي ۲، ۳، ۴ منعكس گرديده است. از مقايسه نمودارهاي مذكور نكتة ديگري نيز دريافت مي‌شود و آن اين‌كه احتمالاً گلوكزآمين از طريق مهار گلوكوكيناز پانكراس، موجب كاهش ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز مي شود. سازوكار عمل گلوكزآمين در ايجاد سوء عملكرد سلول‌هاي بتا نيز ممكن است از طريق اثر مهاري اين تركيب بر روي همين آنزيم كليدي متابوليسم گلوكز در اين سلول‌ها باشد. نكته ديگر كاهش فعاليت گلوكوكيناز در موش‌هاي ديابتي است كه كاهش ترشح انسولين تحريك شده با گلوكز (GSIS) در اين موش‌ها را مي توان به همين مساله مربوط دانست. در مورد اثر گلوكزآمين بر هگزوكيناز پانكراس، نتايج ما نشان مي‌دهد كه چه در موش‌هاي سالم و چه در موش‌هاي ديابتي اثري مشاهده نمي شود، اما بالكان [۱۸] يك افزايش ٤٧ درصدي در هگزوكيناز جزاير تحت تأثير گلوكز آمين گزارش كرده است كه با نتايج ما در اين باره مغايرت دارد. البته در گزارش ياشيكاوا [۱۴] نيز يك افزايش ٤٠ درصدي در هگزوكيناز جزاير كشت و انكوبه شده با گلوكزآمين ذكر شده است. به نظر نمي‌آيد كه افزايش فعاليت هگزوكيناز تحت تأثير گلوكزآمين توجيه منطقي داشته باشد زيرا اين مولكول به عنوان واكنش‌گر هگزوكيناز مطرح نشده است. از سوي ديگر، افزايش فعاليت هگزوكيناز ممكن است ناشي از كاهش گلوكز-٦-فسفات به دليل مهار گلوكوكيناز پانكراس در اثر گلوكزآمين باشد. گلوكز-٦-فسفات كه محصول عمل فسفريلاسيون گلوكز است، مهاركننده آلوستريك هگزوكيناز و نه گلوكوكيناز جزاير لانگرهانس است [۳۳]. اما نكته درخور توجه، افزايش فعاليت هگزوكيناز در موش‌هاي ديابتي نسبت به موش‌هاي سالم است. برخي محققان ديگر از جمله كويتيوت [۳٤] و ميلبورن [۳۵] نيز نتايج مشابهي را گزارش كرده‌اند. هرچند نشان داده شده كه آنزيم گلوكز-٦-فسفاتاز در موشهاي ديابتي افزايش مي يابد [۳٦، ۳۷] و ممكن است يكي از دلايل افزايش هگزوكيناز در موش‌هاي ديابتي، كاهش گلوكز-٦-فسفات ناشي از افزايش فعاليت گلوكز-٦-فسفاتاز باشد كه در نهايت مهار از روي هگزوكيناز برداشته

[1] Dose-dependent

مي‌شود، اما براي يافتن علت اصلي اين افزايش فعاليت آنزيمي، بايد به دنبال توجيهات ديگري نيز بود.
برخي محققان بر اين عقيده اند كه در بيماران ديابتي مبتلا به موتاسيون در گلوكوكيناز (نوعي بيماري ديابت نوع NIDDM=II) كه اختلال شديدي در عملكرد آنزيم فوق ايجاد مي‌شود، سازوكارهاي جبراني باعث افزايش ترشح انسولين مي‌شوند [۳۸]. در اين راستا سازوكارهايي از قبيل Overexpression الل نرمال باقيمانده و نيز كاهش اثر مهاري GKRP پيشنهاد شده است [۳۹]. از سوي ديگر، گفته شده است كه هگزوكيناز هاي با Km پايين، تعيين كننده مقدار انسولين مترشحه در غلظت هاي پايه گلوكز مي‌باشند [٤۰]. شايد يكي ديگر از سازوكارهاي جبراني، همين افزايش هگزوكيناز پانكراس در موش‌هاي ديابتي باشد. و چنان‌چه اين يافته با نتايج مربوط به ترشح انسولين در موش‌هاي ديابتي (نمودار ۳) مقايسه شود شايد بتوان گفت كه همين افزايش هگزوكيناز ممكن است علت افزايش انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي در قياس با موش‌هاي سالم باشد [۴۱]. در اين راستا پيستون و همكاران [۲٤] نيز قبلاً اظهار كرده‌اند كه حسگر گلوكز، چند بخشي است و احتمالاً علاوه بر گلوكوكيناز، هگزوكينازها نيز دخيل‌اند. در مجموع بايد گفت كه شناخت نحوة اثر گلوكوكيناز و يا هگزوكيناز، مستلزم انجام پژوهش‌هاي ژرفتري است. در نتيجه، براساس يافته هاي اين تحقيق مي‌توان برآورد نمود كه كاهش فعاليت گلوكوكيناز جزاير لانگرهانس، احياناً مي‌تواند در كاهش GSIS دخالت داشته باشد. و در نهايت اين‌كه افزايش ترشح انسولين پايه در موش‌هاي ديابتي شايد ناشي از افزايش فعاليت هگزوكيناز پانكراس باشد.

سپاسگزاري

اين تحقيق بخشي از يك پروژة تحقيقاتي مصوب معاونت پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي تهران بوده است. از آقاي مير سعيد يكاني نژاد جهت انجام آناليز آماري نتايج اين مطالعه و آقاي محمد سوختانلو براي ترسيم نمودارها سپاسگزاريم. از اساتيد، كاركنان و دانشجويان گروه بيوشيمي پزشكي نيز به خاطر همكاري هاي مؤثرشان در همة مراحل پژوهش تشكر مي‌كنيم.

مآخذ

1. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39: 647 – 652.
2. Pilkis SJ, Weber IT, Harrison RW, Bell GI. Glucokinase: Structrural analysis of a protein involved in susceptibilitiy to diabetes. *J Biol Chem* 1994; 269: 21925 – 21928.
3. Vandercammen A, Van Schaftingen E. Species and tissue distribution of the regulatory protein of glucokinase. *Biochem J* 1993; 294: 551 – 556.
4. Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA. Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 37125-37130.
5. Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT, Polonsky KS. Glucokinase Mutations, insulin Secretion, and diabetes mellitus. *Ann Rev Physiol* 1996; 58: 171 – 186.
6. Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatie β-cell glucokinase. *Diabetes* 1998; 47: 307 – 315.
7. Gloyn AL et al. Glucokinase (GCK) mutations in hyper and hypoglycemia: maturity – onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat* 2003; 22: 353 – 362.
8. Hattersley AT et al. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 1992; 339: 1307 – 1310.
9. Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, Haynes N-E, Bizzarro FT, Coffey JW, et al. Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 2003; 301: 370 – 374.
10. Brocklehurst KJ, Payne VA, Davies RA, Carroll D, Vertigan HL, Wightman HJ, et al. Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes* 2004; 53: 535 – 541.
11. Lenzen S, Tiedge M, Panten U. Glucokinase in pancreatic B-Cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinologica* 1987; 115: 21 – 29.
12. Tiedge M, Lenzen S. Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT-2 gene expression in pancreatic B-Cells and liver from rats. *Biochem J* 1995; 308: 139 – 144.
13. Kaneto H,Xu G, Song K-H, Suzuma K, Bonner – Weir S, Sharma A, Weir GC. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of

pancreatic β-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; 276: 31099 – 31104.
14. Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimato T, Umeda F, Nawata H. Glucosamine – induced β-cell dysfunction: a possible involvement of glucokinase or glucose – transporter type 2. *Pancreas* 2002; 24: 228 – 234.
15. Postic C, Shiota M, Magnuson MA. Cell – specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56: 195 – 217.
16. Zawalich WS, Dye ES, Matschinsky FM. Metabolism and insulin – releasing capabilities of glucosamine and N-acetylglucosamine in isolated rat islets. *Biochem J* 1979; 180: 145 – 153.
17. Zawalich WS, Zawalich KC. Glucosamine – induced desensitization of β-cell responses: possible involvement of impaired information flow in the phosphoinositide cycle. *Endocrinology* 1992; 130: 3135 – 3142.
18. Balkan B, Dunning BE. Glucosamine inhibits glucokinase in in vitro and produces a glucose – specific impairment of in vivo insulin seretion in rats. *Diabetes* 1994; 43: 1173 – 1179.
19. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35 – 39.
20. Liang Y, Najafi H, Matschinsky FM. Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets from rat pancreas. *J Biol Chem* 1990; 265: 16863-16866.
21. Bonner – Wier S, Trent DF, Honey RN, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited β-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 1981; 30: 64 – 69.
22. Poitout V, Robertson PR. An Integrated view of $\beta-\mathrm{Cell}$ dysfunction in type-II diabetes. *Annu Rev Med* 1996; 47: 69-83.
23. Matschinsky FM. Banting Lecture 1995: A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 1996; 45: 223 – 241.
24. Piston DW, Knobel SM, Postic C, Shelton KD, Magnuson MA. Adenovirus mediated knockout of a conditional glucokinase gene in isolated pancreatic islets reveals an essential role for proximal metabolic coupling events in glucose stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 1999; 274: 1000 – 1004.
25. Chen C, Thorens B, Bonner – Weir S, Weir GC, Leahy JL. Recovery of glucose – induced insulin secretion in a rat model of NIDDM is not accompanied by return of the β-cell $GLUT_2$ glucose transporter. *Diabetes* 1992; 41: 1320 – 27.
26. Portha B, Giroix M-H, Serradas P, Welsh N, Hellerstrom C, Sener A, Malaisse WJ. Insulin production and glucose metabolism in isolated pancreatic islets of rats with NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 1226 – 33.
27. Liu YI, Nevin PW, Leahy JL. β-cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that preserves normoinsulinemia and normoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E68 – E73.
28. Weir GC, Clorere ET, Zmachinki CJ. Bonner – Weir: Islet Secretion in a new experimental model for non – insulin – dependent diabetes. *Diabetes* 1981; 30: 590 – 595.
29. Dachicourt N, Serradas P, Giroix M-H, Gangnerau M-N, Portha B. Decreased glucose – induced cAMP and insulin release in islets of diabetic rats: reversal by IBMX, glucagons, GIP. *Am J Physiol* 1996; 271: E725 – E732.
30. Ashcroft SJH, Crossley JR, Crossley PC. The effect of N-acetyl glucosamine on the biosynthesis and secretion of insulin in the rat. *Biochem J* 1976; 154: 701 – 707.
31. Liang Y, Bonner – Weir S, Wu Y-J, Berdanier CD, Berner DK, Efrat S, Matschinsky FM. In situ glucose uptake and glucokinase activity of pancreatic islets in diabetic and obese rodents. *J Clin Invest* 1994; 93: 2473 – 2481.
32. Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin – resistant spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1994; 94: 399 – 404.
33. Giroix M-H, Sener A, Pipeleers DG, Malaisse WJ. Hexose metabolism in pancreatic islets: inhibition of hexokinase. *Biochem J* 1984; 223: 447 – 453.
34. Kooptiwut, Zraika S, Thorburn AW, Dunlop ME, Darwiche N, Kay TW, Proietto J, Andrikopoulos S. Comparison of insulin secretory function in two mouse models with different susceptibility to β-cell failure. *Endocrinology* 2002; 143: 2085 – 2092.
35. Milburn JL, Hirose H. Pancreatic β-cells in obesity. *J Biol chem.* 1995; 270: 1295 – 1299.
36. Khan A, Chandramouli V, Ostenson CG, Low H, Landau BR, Efendic S. Glucose cycling in islets from healthy and diabetic rats. *Diabetes* 1990; 39: 456 – 459.
37. Khan A, Efendic S. Evidence that increased glucose cycling in islets of diabetic ob/ob mice is a primary feature of the disease. *Am J Physiol* 1995; 269: E 623 – 626.
38. Sreenan SK, Cockburn BN. Abaptation to hyperglycemia enhances insulin secretion in glucokinase mutant mice. *Diabetes* 1998; 47: 1881 – 1888.
39. Sturis J, Kurland IJ. Compensation in pancreatic beta – cell function in subjects with glucokinase mutations. *Diabetes* 1994; 43: 718 – 723.
40. Becker TC, Noel RJ. Differential effects of over expressed glucokinase and hexokinase I in isolated islets. *J Biol Chem* 1996; 271: 390 – 394.
41. Hosokawa H, Hosokawa YA, Leahy JL. Upregulated hexokinase activity in isolated islets from diabetic 90 % pancreatectomized rats. *Diabetes* 1995; 44: 1328 – 1333.